PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07K 14/635, 16/24, G01N 33/78

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 96/10041

A1

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

4. April 1996 (04.04.96)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP95/03757

(22) Internationales Anmeldedatum:

22. September 1995

(22.09.95)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

(30) Prioritätsdaten:

P 44 34 551.8

28. September 1994 (28.09.94)

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Niedersächsisches Institut für Peptidforschung, Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ADERMANN, Knut [DE/DE]; Schleidenstrasse 5, D-30177 Hannover (DE). HOCK, Dieter [DE/DE]; Weinbergstrasse 14, D-74924 Neckarsbischofsheim (DE). MÄGERLEIN, Markus [DE/DE]; Blumenstrasse 5, D-63785 Obernburg (DE).
- (74) Anwalt: GODEMEYER, Thomas; Hauptstrasse 58, D-51491 Overath (DE).
- (54) Title: PEPTIDES FROM THE hPTH SEQUENCE (1-37)
- (54) Bezeichnung: PEPTIDE AUS DER SEQUENZ DES hPTH (1-37)

(57) Abstract

The invention concerns peptides from the human parathyroid hormone (hPTH) sequence (1-37) and containing α -helical amino acid sequence regions and/or non-structured amino acid sequence regions. The said peptides are capable of inducing antibodies when injected into animals. The invention also concerns a diagnostic agent and antibodies obtainable by vaccination of animals with the peptides in question.

(57) Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α-helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ein Diagnostikum und Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den erfindungsgemäßen Peptiden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ΑT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
AU	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GE	Georgien	NE	Niger
BB	Barbados	GN	Guinea	NL	Niederlande
BE	Belgien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	HU	Ungam	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	IE	Irland	PL	Polen
BJ	Benin	IT	Italien	PT	Portugal
BR	Brasilien			RO	Rumänien
BY	Belarus	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	KE	Kenya	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SI	Slowenien
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SN	Senegal
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CN	China	LK	Sri Lanka		
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo Tadschikistan
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
-	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FI	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FR	Limitracu		-		

Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktivem h-PTH.

10

15

20

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für das N-terminale Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von 10⁻¹² mol/l gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radioimmunometric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno Sorbent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Anti-

- 2 -

körper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormon by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.

- Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.
- Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)
 enthaltend α-helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder
 nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die
 Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminale α-Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine Cterminale α-Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des
 hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:

- 3 -

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-Met^8-His^9-Asn^{10}-OH$$
 (1)

hPTH 1-9

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-Met^8-His^9-OH$$
 (2)

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-Met^8-OH$$
 (3)

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-OH$$
(4)

hPTH 1-6

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-OH$$
(5)

hPTH 1-5

15

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-OH$$
(6)

hPTH 9-18

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (7)

hPTH 10-18

$$NH_2-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (8)

25 hPTH 11-18

$$NH_2-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (9)

hPTH 12-18

$$NH_2-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (10)

30

$$NH_2-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (11)

hPTH 14-18

35
$$NH_2-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (12)

- 4 -

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-OH$$
 (13)

hPTH 9-16

$$_{5} NH_{2}-His^{9}-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-OH$$
 (14)

hPTH 9-15

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-OH$$
 (15)

10 hPTH 9-14

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-OH$$
 (16)

hPTH 9-13

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-OH$$
 (17)

15 hPTH 24-37

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
(18)

hPTH 25-37

hPTH 26-37

$$NH_2-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (20)

hPTH 27-37

$$NH_2-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
(21)

30

hPTH 28-37

$$NH_2-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (22)

hPTH 29-37

$$NH_2-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (23)

- 5 -

$$NH_2-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (24)

hPTH 31-37

$$_{\text{NH}_2-\text{Val}^{31}-\text{His}^{32}-\text{Asn}^{33}-\text{Phe}^{34}-\text{Val}^{35}-\text{Ala}^{36}-\text{Leu}^{37}-\text{OH}}$$
 (25)

hPTH 32-37

$$NH_{2}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (26)

10 hPTH 33-37

$$NH_2-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (27)

hPTH 24-36

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-15$$

$$Val^{35}-Ala^{36}-OH$$
(28)

hPTH 24-35

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-OH$$
 (29)

20

hPTH 24-34

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-OH$$
(30)

25 hPTH 24-33

$${\rm NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-OH} \eqno(31)$$

hPTH 24-32

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-OH$$
 (32)

30

hPTH 24-31

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-OH$$
 (33)

hPTH 24-30

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-OH$$
 (34)

- 6 -

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-OH$$
 (35)

hPTH 24-28

25

30

$$^{5} NH_{2}-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-OH$$
 (36)

Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37 in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerläßlich sind, ist es mit dem erfindungsgemäßen Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfindungsgemäß können also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem soweit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am Nterminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten.

- 7 -

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin,
Ovalalbumin oder Mausserumalbumin etc. gebunden sein. Die
Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch
Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemässen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunoglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fraktionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide aufweisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F_{ab} und F_{c} auch deren Fragmente wie F_{ab} oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

30

25

Festphasensynthese der Peptide:

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-

- 8 -

Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang-Harz, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang-Harz, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxy-20 tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazbicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und 30 im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30-90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylet-

- 9 -

her ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wäßriger Lösung lyophilisiert.

5

Beispiel 2

Reinigung und Analyse

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

15

Die Reinheit der Produkte wird durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

20 Beispiel 3

Kopplung an Carrierprotein

Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid-Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhälnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man läßt eine Stunde inkubieren.

- 10 -

Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

5

Beispiel 4

Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an Cterminales Alanin, gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

Beispiel 5

20 Immunisierung

25

Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

Das Boostern erfolgt nach 2-4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkomplettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.

Patentansprüche

- Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α-helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.
- 10 2. Peptide nach Anspruch 1 aus hPTH (1-37) mit der Sequenz

15 hPTH 1-9
$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-Met^8-His^9-OH$$
 (2)

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-Met^8-OH$$
 (3)

hPTH 1-7 $NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-Leu^7-OH$ (4)

hPTH 1-6

$$NH_2-Ser^1-Val^2-Ser^3-Glu^4-Ile^5-Gln^6-OH$$
 (5)

hPTH 1-5

$$NH_2$$
-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH (6)

- 12 -

hPTH 10-18

$$NH_2-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (8)

hPTH 11-18

$$NH_2-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (9)

hPTH 12-18

$$NH_2-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (10)

10 hPTH 13-18

$$NH_2-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (11)

hPTH 14-18

$$NH_2-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-Met^{18}-OH$$
 (12)

15

hPTH 9-17

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-Ser^{17}-OH$$
 (13)

hPTH 9-16

$$^{20} NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-Asn^{16}-OH$$
 (14)

hPTH 9-15

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-Leu^{15}-OH$$
 (15)

25 hPTH 9-14

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-His^{14}-OH$$
 (16)

hPTH 9-13

$$NH_2-His^9-Asn^{10}-Leu^{11}-Gly^{12}-Lys^{13}-OH$$
 (17)

30

hPTH 24-37

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (18)

- 13 -

$$NH_2-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (19)

5 hPTH 26-37

$$NH_2-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (20)

hPTH 27-37

$$NH_2-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
(21)

hPTH 28-37

$$NH_2-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-$$
 15 OH (22)

hPTH 29-37

$$NH_2-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (23)

20 hPTH 30-37

$$NH_2-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (24)

hPTH 31-37

$$NH_2-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (25)

25

hPTH 32-37

$$NH_{2}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (26)

hPTH 33-37

$$_{NH_2-Asn}^{33-Phe}^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-Leu^{37}-OH$$
 (27)

hPTH 24-36

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-Ala^{36}-OH$$
 (28)

- 14 -

hPTH 24-35

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-Val^{35}-OH$$
 (29)

5

hPTH 24-34

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-Phe^{34}-OH$$
 (30)

10 hPTH 24-33

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-His^{32}-Asn^{33}-OH$$
 (31)

hPTH 24-32

hPTH 24-31

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-Val^{31}-OH$$
 (33)

20 hPTH 24-30

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-Asp^{30}-OH$$
 (34)

hPTH 24-29

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-Gln^{29}-OH$$
 (35)

25

hPTH 24-28

$$NH_2-Leu^{24}-Arg^{25}-Lys^{26}-Lys^{27}-Leu^{28}-OH$$
 (36)

3. Peptide nach Anspruch 1 und/oder 2, die am N-terminalen
Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende
modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten,
und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin,
Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.

- 15 -

- 4. Diagnostikum, erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, Gewinnung von Immunoglobulinen enthaltenden Fraktionen aus den immunisierten Tieren und Isolierung von Fraktionen, die einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen und das gegebenenfalls weiter Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.
- 5. Antikörper oder Fragmente von Antikörpern erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit mindestens einem Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3.
- 6. Verwendung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37).

20

15

5

Interv nal Application No PC1/EP 95/03757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/635 C07K16 C07K16/24 G01N33/78 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CO7K GO1N IPC 6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claim No. Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Category ' WO, A, 94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17 1,2 X February 1994 see claims; example 1 1,2 CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, X 24 May 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' see abstract & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 -/--Patent family members are listed in annex. Further documents are listed in the continuation of box C. lх X Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to "E" earlier document but published on or after the international filing date involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or "Y" document of particular relevance; the claimed invention which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled other means in the art. document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of mailing of the international search report Date of the actual completion of the international search **26.01.96** 10 January 1996 Name and mailing address of the ISA Authorized officer European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fuhr, C Fax: (+31-70) 340-3016

Inters nal Application No
PCT/EP 95/03757

		PC1/EP 95/03/5/
(Continua	Otation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
ucgory	Season of booming will mendatory the opposite the season of the season o	
	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1 February 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal' antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' see abstract & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.;EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981	1,2,4-6
	JOURNAL OF IMMUNOASSAY, vol. 13, no. 1, 1992 NEW YORK, US, pages 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' cited in the application see page 2, paragraph 2 see page 4, paragraph 1 see results and discussion of the pages 5-12	1-6
X	J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' see page 567, right column, paragraph 2 see page 568, right column, paragraph 5; figure 1; table 1	1,2
x	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26 October 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' see abstract & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981	1,2
X	FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8 February 1985 see fragment 10 of page 25 and fragment 40 of page 50.	1-3

Intern 1al Application No
PCT/EP 95/03757

		PCT/EP 95/037	5/
Continuat	ion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Polevs	ant to claim No.
ategory *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Releva	
(E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, see page 169, paragraph 3		1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 208, 1986 NEW YORK, US, pages 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' see figure 1		
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16 May 1991 see page 5, paragraph 3; claims 1-5,14		1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11 July 1985 see claims; examples		1,4-6

Interv nal Application No
PCT/EP 95/03757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- EP-A-	2141588 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- JP-B- JP-A- JP-A- DE-A- US-A-	1684818 3052479 60034996 61024598 3428942 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- AT-T- AU-B- AU-B- CA-A- DE-D- EP-A- ES-T-	3935738 121424 643725 6871291 2071538 59008949 0497915 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
 DE-A-3347548	11-07-85	NONE		

Inter valles Aktenzeichen

PCT/EP 95/03757 A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C07K14/635 C07K16/24 G01 G01N33/78 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07K G01N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Betr. Anspruch Nr. Kategorie* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile X WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 1,2 17.Februar 1994 siehe Ansprüche; Beispiel 1 CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, X 1,2 24.Mai 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594. 'Action of NAKAMURA, RYUICHI ET AL fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' siehe Zusammenfassung & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie X X entnehmen Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Täugkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, 'O' Veroffentlichung, die sich auf eine munische Orienteaung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 26.01.96 10.Januar 1996 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Fuhr, C

Interr nales Aktenzeichen
PCT/EP 95/03757

TLOURGE	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
ategorie"	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komi	menden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5,		1,2,4-6
,	1.Februar 1982		
	Columbus, Ohio, US;		
	abstract no. 29060,		
	NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal		
	antibodies directed against the		
	biologically active region of parathyroid		
	biologically active region of parachyroid		
	hormone'		
	siehe Zusammenfassung		
	& MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES.		
	(1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT		
	È.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN,		
	NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ,		
	1981		
			1-6
X	JOURNAL OF IMMUNOASSAY,		1-0
	Bd. 13, Nr. 1, 1992 NEW YORK, US,		
	Seiten 1-13,		
	J. TAMPE ET AL. 'Characterization of		
	Antibodies against Human N-Terminal		
	Parathyroid Hormone by Epitope Mapping'		
	in der Anmeldung erwähnt		
	siehe Seite 2, Absatz 2		
	siehe Seite 4, Absatz 1		
	siehe 'results' und 'discussion' auf den		
	Seiten 5-12		
	Je (tell 3 12		
X	J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3),		1,2
^	567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565,		
	1981		
	PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive		
	PANG, PETER R. 1. LI AL Hypotensite		
	action of synthetic fragments of		1
	parathyroid hormone'		
	siehe Seite 567, rechte Spalte, Absatz 2		
	siehe Seite 568, rechte Spalte, Absatz 5;		
	Abbildung 1; Tabelle 1		}
	17		1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17,		1,2
	26.0ktober 1981		
	Columbus, Ohio, US;		
	abstract no. 144316,		
	HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of		
1	parathyroid hormone and related		
	polypeptides on the heart and coronary		
	circulation of dogs'		
	siehe Zusammenfassung		
	& J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4),		
	668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446,		
	1981		
l	1301		
] ,	FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8.Februar		1-3
X			
	1985		
ł	siehe Fragment 10 auf Seite 25 und		
	Fragment 40 auf Seite 50		
1	-/		
			1

Interr males Aktenzeichen
PCT/EP 95/03757

		PCI/EP 95	70373.
C.(Fortsetzu	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kom	menden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E. Wingender et al. 'Structure- Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, siehe Seite 169, Absatz 3		1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 208, 1986 NEW YORK, US, Seiten 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' siehe Abbildung 1		1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16.Mai 1991 siehe Seite 5, Absatz 3; Ansprüche 1-5,14		1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11.Juli 1985 siehe Ansprüche; Beispiele		1,4-6

Interr nales Aktenzeichen
PCT/EP 95/03757

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- EP-A-	2141588 0656784	17-02-94 14-06-95	
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- JP-B- JP-A- JP-A- DE-A- US-A-	1684818 3052479 60034996 61024598 3428942 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87	
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- AT-T- AU-B- AU-B- CA-A- DE-D- EP-A- ES-T-	3935738 121424 643725 6871291 2071538 59008949 0497915 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95	
DE-A-3347548	11-07 - 85	KEINE			